



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 508 257 A2**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 92105443.3

⑭ Int. Cl. 5: **G02B 21/00**

⑮ Anmeldetag: 30.03.92

⑯ Priorität: 12.04.91 DE 4111903

⑰ Anmelder: **BAYER AG**

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
14.10.92 Patentblatt 92/42

W-5090 Leverkusen 1 Bayerwerk(DE)

⑯ Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB IT LI NL SE

⑰ Erfinder: **Jacobsen, Wolfgang, Dr.**
Bergisch-Gladbacher-Strasse 1246
W-5000 Köln 80(DE)

⑯ Spektroskopiekorrelierte Licht-Rastermikroskopie.

⑯ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung und Korrelation lichtmikroskopischer Bilder und mit nach Wellenlängen aufgelösten Meßdaten von Proben durch ein- oder zweimalige Abtastung einzelner Elemente der abzubildenden Probenfläche mit einem konfokalen, scannenden Lichtmikroskop, Einkoppeln eines Teiles des Lichtes aus dem Abbildungsstrahlengang in ein Spektrometer und Korrelation der Bildinformation mit den spektroskopischen Daten durch Abspeicherung der spektroskopischen Daten in einem zweidimensionalen Bereich, wobei eine Dimension zur Speicherung des gemessenen Spektrums der einzelnen Elemente verwendet wird und die zweite Dimension mittels der von den abgerasterten Elementen remittierten Lichtintensität oder eines aus der Gesamtinformation des Probenbildes mittels Bildverarbeitung gewonnenen Kriteriums angesteuert wird.

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der vollen Ausnutzung der Möglichkeiten eines konfokalen, scannenden Lichtmikroskops und der der verschiedenen spektroskopischen Verfahren.

EP 0 508 257 A2

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung und Korrelation lichtmikroskopischer Bilder und mit nach Wellenlänge aufgelösten Meßdaten von Proben mittels konfokaler, scannender Lichtmikroskopie und Spektrometern.

Es ist bekannt (Applied Physics 22(1980), p.119), lichtmikroskopische Aufnahmen von transparenten oder semitransparenten Testobjekten durch scannende Lichtmikroskopie zu erstellen. Entspricht der Strahlengang dem Prinzip des konfokalen Lichtmikroskops (CLSM), so erhält man sogenannte optische Schnittbilder, d.h. Bilder von einer schmalen Zone um die Fokusebene des Mikroskop-Objektivs. Liegt die Fokusebene innerhalb des untersuchten Objektes, so werden infolge des konfokalen Prinzips die Intensitäten aus den darüber und darunter liegenden Bereichen der Probe weitgehend eliminiert. Seit mehreren Jahren sind Geräte, die nach dem Prinzip arbeiten, kommerziell erhältlich.

Es ist ferner bekannt, Informationen über die chemische Struktur eines Prüfobjektes dadurch zu gewinnen, daß dieses Objekt durch spektroskopische Methoden untersucht wird, insbesondere auch unter Verwendung von Licht aus dem sichtbaren Spektralbereich oder aus Bereichen in der Nähe des sichtbaren Spektrums.

Auch die Kopplung lichtmikroskopischer und spektroskopischer Techniken ist aus der Literatur bekannt:

Bereits von den meisten Herstellern kommerzieller konfokaler Lichtmikroskope realisiert ist das Konzept der Erzeugung von Remissionsbildern im Fluoreszenzkontrast. Hierzu wird die Probe mit einer monochromatischen Lichtquelle beleuchtet. In den Abbildungsstrahlengang wird ein optisches Filter eingefügt, das das Licht mit der Wellenlänge der Beleuchtungslichtquelle möglichst vollständig zurückhält, so daß nur das längerwellige Fluoreszenzlicht zum Fotoempfänger gelangt.

Durch Microscopia Acta 79 (1977), 3, p. 267-276, ist weiter die Ergänzung des Abbildungsstrahlengangs eines konventionellen Lichtmikroskops um einen Spektrographen bekannt, der auf eine bestimmte Raman-Linie einer ausgewählten, im Prüfobjekt vorhandenen Substanz eingestellt war. Auf diese Weise wird eine mikroskopische Raman-Dunkelfeldaufnahme des Objektes erzeugt. Diese Aufnahme gibt die örtliche Verteilung der ausgewählten Substanz in dem Prüfobjekt wieder.

Aus Nature 347, (20.09.1990) p.301-303, ist bekannt, das Konzept des konfokalen, optischen Strahlengangs zu nutzen, um das vollständige Raman-Spektrum eines kleinen vorwählbaren Meßvolumens innerhalb des Prüfobjektes aufnehmen zu können. Hierzu wird das Prüfobjekt mit einem Laser über eine stationäre Anordnung nach dem Konzept des konfokalen Strahlengangs beleuchtet

und das durch die Lochblende des Abbildungsstrahlengangs hindurchgehende Licht in einem Raman-Spektrometer analysiert. Auf diese Weise erhält man das Raman-Spektrum eines ausgewählten Meßvolumens der Größenordnung $1 \mu\text{m}^3$.

Nachteile aller dieser in der Literatur bekannten Verfahren der Kopplung lichtmikroskopischer und spektroskopischer Techniken ist, daß die volle Leistungskraft beider Techniken nicht gleichzeitig voll ausgeschöpft wird: Das bisher übliche Verfahren der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie nutzt nur die mittlere vom jeweiligen Meßfilter durchgelassene Fluoreszenzintensität zum Bildaufbau aus. Die Einzelheiten des Fluoreszenz-Spektrums werden dagegen nicht genutzt. Das Verfahren nach Microscopia Acta 79 (1977), 3, p. 267-276, liefert keine dreidimensionalen mikroskopischen Informationen wie die konfokale Lichtmikroskopie, sondern nur zweidimensionale Bilder und verwendet Überdies von den in den Raman-Spektren vorhandenen Informationen bei einer Aufnahme jeweils nur diejenigen einer vorher ausgewählten Linie.

Das Verfahren nach Nature 247, p. 301-303, bietet wegen der fehlenden scannenden, mikroskopischen Bilderzeugung ebenfalls keine dreidimensionale mikroskopische Information, wohl aber liefert es das gesamte Raman-Spektrum des untersuchten Probenvolumens.

Es bestand daher die Aufgabe, ein Verfahren zu finden, daß die Ausnutzung der vollen Leistungsfähigkeit konfokaler, scannender Lichtmikroskope und spektrometrischer Methoden zuläßt.

Insbesondere bestand die Aufgabe darin, eine datenreduzierende Art der Korrelation zwischen dem durch das konfokale, scannende Lichtmikroskop erhaltene Bild einer Probe und seinem Spektrum zu finden.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß folgende Schritte durchgeführt werden:

a) ein- oder zweimalige Abtastung einzelner Elemente der abzubildenden Probenfläche mit einem konfokalen, scannenden Lichtmikroskop;
 b) Einkoppeln eines Teiles des Lichtes aus dem Abbildungsstrahlengang in ein Spektrometer;
 c) Korrelation der Bildinformation mit den spektroskopischen Daten durch Abspeicherung der spektroskopischen Daten in einem zweidimensionalen Bereich, wobei eine Dimension zur Speicherung des gemessenen Spektrums der einzelnen Elemente verwendet wird und die zweite Dimension mittels der von den abgerasterten Elementen remittierten Lichtintensität oder eines aus der Gesamtinformation des Probenvolldes mittels Bildverarbeitung gewonnenen Kriteriums angesteuert wird.

Weitere bevorzugte Durchführungsformen sind den Unteransprüchen zu entnehmen.

Als konfokales, scannendes Lichtmikroskop

12.5.96

sind alle Anordnungen geeignet, bei denen der Probenausschnitt mit einem fokussierenden Lichtstrahl abgetastet wird und bei denen ein Teil des durchgehenden oder des gestreuten Lichtes durch einen abbildenden, optischen Strahlengang auf eine Lochblende oder auf ein System von Lochblenden abgebildet wird und bei denen der durch die jeweilige Lochblende hindurchgehende Teil dieses Lichtes mit einem fotoelektrischen Detektor gemessen und mit Hilfe dieses Meßsignals ein Bild des gesamten Probenausschnittes erzeugt wird. Insbesondere seien Anordnungen entsprechend dem Konzept des konfokalen Laserscanning-Mikroskops (vgl. z.B. T. Wilson Ed., Confocal Microscopy, Academic Press London etc. 1990) und Anordnungen entsprechend dem Konzept der rotierenden Lochscheibe genannt. Das auf diese Weise erzeugte Bild des Probenausschnittes kann sowohl ein Schnittbild senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops sein als auch das Bild einer beliebig orientierten Schnittebene, insbesondere auch einer solchen, die in der Richtung der optischen Achse des Mikroskops verläuft.

Als spektroskopische Meßverfahren seien alle Methoden genannt, die auf der Registrierung der wellenlängenabhängigen Intensität von sichtbarem Licht beruhen bzw. von Licht mit einer Wellenlänge in der Nähe des sichtbaren Lichtes, z.B. von 100 nm bis 20 μ m. Insbesondere seien genannt die Absorptionsspektroskopie im ultravioletten, im sichtbaren, im nahen Infrarot- und im Infrarotbereich sowie die Fluoreszenz- und die Raman-Spektroskopie. Die Anregungswellenlänge für die Fluoreszenz-Spektroskopie liegt wiederum im Bereich 100 nm bis 20 μ m, vorzugsweise im Bereich 300 nm bis 700 nm. Die Anregungswellenlänge für die Raman-Spektroskopie liegt ebenfalls im Bereich 100 nm bis 20 μ m, vorzugsweise im Bereich 250 nm bis 1,5 μ m.

Als simultan registrierendes Spektrometer seien alle Anordnungen genannt, die es gestatten, für den gesamten für das jeweilige spektroskopische Verfahren relevanten Wellenlängenbereich oder für Teile davon die im Meßlicht enthaltene Strahlungsintensität pro Wellenlängenintervall zeitaufgelöst zu messen. Bevorzugt seien genannt ein Einfach- oder Mehrfach-Spektrograph, besonders bevorzugt eine Dreifach-Spektrographenanordnung mit einem linienförmigen oder flächenförmigen fotoelektrischen Empfänger. Besonders bevorzugt sei als Empfänger ein zweidimensionales CCD-Array (charge coupled device) genannt.

Es ist überraschend, daß trotz der mehrjährige Nutzung kommerziellen Nutzung des konfokalen Lichtmikroskops bisher noch keine volle Kopplung mit spektroskopischen Techniken realisiert worden ist. Allerdings führt eine unmittelbare und direkte Kopplung ohne besondere Maßnahmen zur Daten-

reduktion zu enormen Datenraten und Datenmengen, wie das folgende Zahlenbeispiel zeigt: Spektroskopische Intensitätsmessungen mit 8 Bit Auflösung und auf 1 024 Wellenlängen-Stützpunkten führen in Verknüpfung mit der Erzeugung eines Bildes von 512*512 Pixeln zu einer Datenmenge von 268 MByte pro Bild und damit bei einer Bildfrequenz von 1 Hz zu einer Datenrate von 268 MByte/sec.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die simultane oder aufeinanderfolgende Aufnahme eines konfokalen, lichtmikroskopischen, optischen Schnittbildes einerseits und eines Satzes von spektroskopischen Intensitätsverteilungen andererseits, und zwar derart, daß anhand dieser Informationen anschließend zu jedem geeignet gewählten Ausschnitt dieses optischen Schnittbildes das zugeordnete mittlere Spektrum des eingesetzten spektroskopischen Verfahrens angegeben werden kann. D.h. für die im lichtmikroskopischen Bild durch unterschiedlichen Kontrast hervortretenden morphologischen Strukturelemente lassen sich getrennte Informationen über deren chemische Struktur ermitteln. Beispiele sind die stoffliche Identifizierung der einzelnen Phasen in mehrphasigen Polymeren, die Lokalisierung und Identifizierung von Additiven und von Verunreinigungen in Polymeren oder die Lokalisierung von Wirkstoffen in biologischen Präparaten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachfolgenden Beispiele und durch die Zeichnung näher erläutert.

Fig. 1 zeigt einen prinzipiellen Aufbau zur Durchführung des Verfahrens,

Fig. 2 erläutert die Durchführung des Verfahrens mit einer mechanischen Zuordnung der Spektren zu den Bildpunkten,

Fig. 3 erläutert die Durchführung des Verfahrens mit einer elektronischen Zuordnung der Spektren zu den Bildpunkten,

Fig. 4 zeigt die Aufteilung eines Probenbildes in fünf Objekte und den Untergrund durch ein Bildanalysesystem.

Die prinzipielle Durchführung des Verfahrens sei anhand eines konfokalen Laserscanning-Mikroskopes erläutert:

Das vom Laser 1 emittierte Licht wird über eine Fokussierungsoptik 2 auf die Eintritts-Lochblende 3 fokussiert. Diese Blende wird vom Mikroskopobjektiv 4 auf bzw. in die zu untersuchende Probe 5 abgebildet. Die zwischen Blende und Objektiv liegende Ablenkeinheit 6 führt dazu, daß dieser Laserstrahl den gewählten Probenausschnitt zeilenförmig abstrahert.

Das von der Probe remittierte Licht wird vom Mikroskopobjektiv 4 wieder gesammelt und über

den Strahlenteiler 7 auf eine zweite Lochblende 8 fokussiert. Ein Teil des durch diese Blende hindurchgehenden Lichtes wird durch den Strahlenteiler 9 hindurch über eine weitere Optik 10 auf einen Fotoempfänger 11 geleitet. Das von dem Fotoempfänger erzeugte elektrische Signal wird in der Signalverarbeitungseinheit 12 verstärkt und analog/digital gewandelt. Das digitalisierte CLSM-Bild kann in einem Rechnersystem 13 weiterverarbeitet, gespeichert und auf einem Ausgabegerät 14 angezeigt werden.

Der vom Strahlenteiler 9 abgelenkte Teil der Rückstreuintensität wird von der Optik 15 auf den Eintrittsspalt des Spektrographen 16 abgebildet. Dieser erzeugt hiervon simultan eine spektrale Zerlegung, die vom linien- oder flächenförmigen Fotoempfänger 17 detektiert wird. Das elektrische Signal dieses Fotoempfängers wird in der spektroskopischen Auswerteeinheit 18 verstärkt.

In den beiden Beispielen wird die Kopplung eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops mit einem Raman-Spektrographen beschrieben. Die Beispiele unterscheiden sich in der Art der Registrierung der spektroskopischen Meßdaten.

Beispiel 1 beschreibt die Ablenkung des Raman-Streulichtes mit einem Drehspiegel.

Die Einzelheiten der technischen Durchführung bei diesem Beispiel werden anhand der Fig. 2 veranschaulicht.

Ein kommerzielles CLSM 21 wird mit einem kommerziellen Dreifach-Spektrographen 16 dadurch gekoppelt, daß über einen Strahlenteiler 9 ein Teil des durch die Meßblende hindurchgehenden Meßlichtes aus dem Meßkanal des CLSM ausgetrennt und über die Lichtleitfaser 24 in den Spektrographen eingeführt wird. Die ersten beiden Stufen des Spektrographen halten das elastisch, also ohne Wellenlängenänderung, gestreute Laserlicht zurück. Es verbleibt das durch Fluoreszenz oder durch den Raman-Effekt gestreute Licht. Dieses wird in der dritten Stufe des Spektrographen spektral zerlegt und auf das gekühlte zweidimensionale CCD-Array 17 abgebildet. Die Ortskoordinate auf dem CCD-Array, entlang der die spektrale Zerlegung des Meßlichtes erfolgt ist, wird im folgenden mit x bezeichnet.

Zwischen dem Austrittsspalt des Spektrographen und dem CCD-Array befindet sich eine Relaisoptik 26 mit einem elektromotorgesteuerten Drehspiegel 27. Durch den Drehspiegel ist eine Ablenkung des Meßlichtes in der zur oben erläuterten x-Richtung senkrechten y-Richtung des Arrays möglich.

Die Steuerung dieses Drehspiegels erfolgt nun über die in der zweiten Stufe des Spektrographen 16 mit dem Fotoempfänger 28 gemessene Intensi-

tät des elastisch in der Probe gestreuten Lichtes. Dies ist andererseits aber auch die Größe, die den Kontrast im konventionellen CLSM-Remissionsbild erzeugt. Das Fotoempfängersignal wird im Verstärker 29 verstärkt.

Die während eines vollständigen Scanprozesses zur Aufnahme eines CLSM-Bildes in dem CCD-Array gemessene Raman- (und Fluoreszenz-) Intensität wird danach ausgelesen und an den Rechner 18 zur weiteren Verarbeitung übertragen. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses kann auch über mehrere CLSM-Scans gemittelt werden.

Entscheidend für die Zuverlässigkeit der soeben beschriebenen Auswertungen ist die Abstimmung der Einstellzeit des Drehspiegels mit der Scanfrequenz des CLSM. Denn es muß sichergestellt sein, daß der Drehspiegel den der Struktur der untersuchten Probe entsprechenden zeitlichen Veränderungen der Remissions-Intensität ausreichend rasch folgen kann. Fordert man für die spektroskopische Zuordnung eine Ortauflösung von 5 Pixel und besitzt das CLSM-Bild eine Auflösung von 512*512 Pixel und eine Bildfrequenz von 1 Hz, so ist eine Spiegel-Einstellzeit von ca. 20 µsec erforderlich. Reduziert man die Bildfrequenz z.B. auf 0,05 Hz, so ist eine Spiegel-Einstellzeit von ca. 0,4 msec ausreichend.

Beispiel 2 beschreibt die elektronische Sortierung der Raman-Streuintensitäten.

Die Einzelheiten der technischen Durchführung bei diesem Beispiel werden anhand der Fig. 3 veranschaulicht.

Die optische und optoelektronische Ausführung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops 31 und des Spektrographen 32 ist mit der im Beispiel 1 beschriebenen Anordnung identisch. Die aus dem Spektrographen austretende Raman- (und Fluoreszenz-) Intensität trifft in diesem Beispiel direkt auf ein eindimensionales CCD-Array 17 mit 1,024 Elementen. Die spektrale Zerlegung des Spektrographen ist so gewählt, daß der relevante Spektralbereich von diesem CCD-Array gerade erfaßt wird.

Die Übernahme der Raman-Intensität von den primären Fotodioden in die Ausgabezeile erfolgt synchron zur Detektion des eigentlichen CLSM-Bildes, indem das Synchronsignal 34 der CLSM-Elektronik an das CCD-Array übertragen wird. Diese Raman-Intensitäten werden in der Auslese-Elektronik 35 verstärkt und ergeben nach Analog/Digitalwandlung einen Datensatz von 1 024*8Bit = 1 kByte pro Bildpixel. Diese Datensätze werden synchron zum Aufbau des konventionellen CLSM-Bildes in einem Speicherblock 36 von N Plätzen zu je 1 kByte aufaddiert. Die Zahl H liegt

Üblicherweise im Bereich $1 \leq N \leq 10$. Die Zuordnung erfolgt über eine sogenannte look-up-table (LUT), in der für jedes Bildpixel eine dieser Adressen 1 bis N vorgegeben wird. Geschieht die Zuordnung über die in H-Bereiche aufgelöste Intensitätsbestimmung des in der zweiten Stufe des Spektrometers gemessenen elastisch in der Probe gestreuten Lichtes, so läßt sich diese Zuordnung auf einfache Weise mit einem einzigen Scan der Probe realisieren, indem beispielsweise das Intensitätssignal, das im ersten Beispiel den Spiegel steuerte, zur Addressierung der Speicherplätze der Raman-spektren im Speicherblock 36 verwendet wird. Andernfalls wird die LUT in einem der Aufnahme der Raman-Intensitäten vorangehenden Schritt berechnet:

Hierzu wird an demselben Probenausschnitt ein konventionelles CLSM-Rückstrebild aufgenommen und an das Bildanalysesystem 37 übertragen. Dieses Gerät führt an diesem Bild nach problemspezifisch festzulegenden Methoden Bildbereinigungs- und Bildverarbeitungsoperationen mit dem Ziel der Objekterkennung durch. Z.B. können alle ein- oder zweifach zusammenhängenden Objekte detektiert werden, die in sich eine annähernd gleiche Rückstreuintensität aufweisen und sich gegenüber ihrer Umgebung in dieser Intensität ausreichend unterscheiden und die überdies eine gewisse Mindestgröße aufweisen. Auf diese Weise wird der abgebildete Probenausschnitt in eine Anzahl von Objekten und - als Rest - deren Umgebung aufgeteilt. Letztere kann wieder aus mehreren Teilbereichen bestehen. D.h. es entstehen insgesamt N Objekte, aus denen das Bild des Probenausschnittes zusammengesetzt ist. Fig. 4 gibt ein typisches Beispiel einer derartigen Aufteilung (a, b, c, d, e und Hintergrund f) wieder. Falls die Zahl N für die anschließende Raman-Detektion noch zu groß ist, werden die Objekte anhand zusätzlicher Kriterien in Klassen eingeteilt. Schließlich werden die Objekte bzw. Objektklassen durchnumeriert. Der Aufbau der obengenannten LUT besteht nun nur noch darin, für jedes Bildpixel zu bestimmen, zu welchem dieser H Objekte es gehört. Anschließend wird diese LUT vom Bildanalyse-Rechner an die Steuerelektronik der Raman-Signaldetektion übertragen 38.

Sind beide Schritte:

- Aufnahme des konventionellen CLSM-Bildes und bildanalytische Berechnung der LUT und
- Aufnahme der Raman-Intensitäten getrennt für jedes der unter a) definierten Objekte abgeschlossen, kann für jedes der im CLSM-Bild erkannten Objekte das Raman-Spektrum analysiert werden. Ist z.B. durch andere analytische Verfahren die chemische Zusammensetzung der Probe als Ganzes bekannt, kann für jedes dieser Objekte das gemessene Raman-Spektrum mit den bekannten Raman-Spektren dieser in der Probe enthaltenen

chemischen Bestandteile verglichen werden. Insbesondere kann durch bekannte mathematische Verfahren (z.B. bekannt aus Appl. Spectrosc. 33 (1979), p. 351-357) der Anteil dieser chemischen Bestandteile in den einzelnen Objekten des CLSM-Rückstrebildes quantitativ bestimmt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung und Korrelation lichtmikroskopischer Bilder und mit nach Wellenlängen aufgelösten Meßdaten von Proben unter Durchführung der folgenden Schritte:
 - ein- oder zweimalige Abtastung einzelner Elemente der abzubildenden Probenfläche mit einem konfokalen, scannenden Lichtmikroskop;
 - Einkoppeln eines Teiles des Lichtes aus dem Abbildungsstrahlenganges in ein Spektrometer;
 - Korrelation der Bildinformation mit den spektroskopischen Daten durch Abspeicherung der spektroskopischen Daten in einem zweidimensionalen Bereich, wobei eine Dimension zur Speicherung des gemessenen Spektrums der einzelnen Elemente verwendet wird und die zweite Dimension mittels der von den abgerasterten Elementen remittierten Lichtintensität oder eines aus der Gesamtinformation des Probenbildes mittels Bildverarbeitung gewonnenen Kriteriums angesteuert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Spektrum mittels eines Fotoempfängerfeldes gemessen und digitalisiert wird und in einem aus einer endlichen Zahl von Speichern mittels des digitalisierten Wertes der remittierten Lichtintensität ausgewählten Speichers abgespeichert wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Spektrum eines abgerasterten Elementes als Linie auf ein zweidimensionales Fotoempfängerfeld fokussiert wird und das Spektrum mittels einer im Strahlengang des Spektrometers angebrachten Ablenkeinheit, die mittels der remittierten Lichtintensität steuerbar ist, senkrecht verschoben wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Fotoempfänger ein- oder zweidimensionale Anordnungen von lichtempfindlichen Halbleitern oder Sekundärelektronenvervielfächern verwendet werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, da-

durch gekennzeichnet, daß als Ablenkeinheit ein elektrisch angetriebener Drehspiegel verwendet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das in einem ersten Abtasten gewonnene Bild der Probe durch das Bildverarbeitungssystem in mehrere Bereiche unterteilt wird, denen die durch ein zweites Abtasten der Probe erhaltenen Spektren zugeordnet werden. 5
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als konfokales, scannendes Lichtmikroskop ein Mikroskop mit monochromatischer Lichtquelle oder ein Mikroskop mit einer ein kontinuierliches Spektrum aussendenden Lichtquelle verwendet wird. 15
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Spektrometer eines oder eine Kombination der folgenden Spektrometer verwendet wird:
 - a) Raman-Spektrometer;
 - b) Fluoreszenzspektrometer;
 - c) Ultraviolettspektrometer;
 - d) Visuellspektrometer;
 - e) Infrarotspektrometer.20

30

35

40

45

50

55

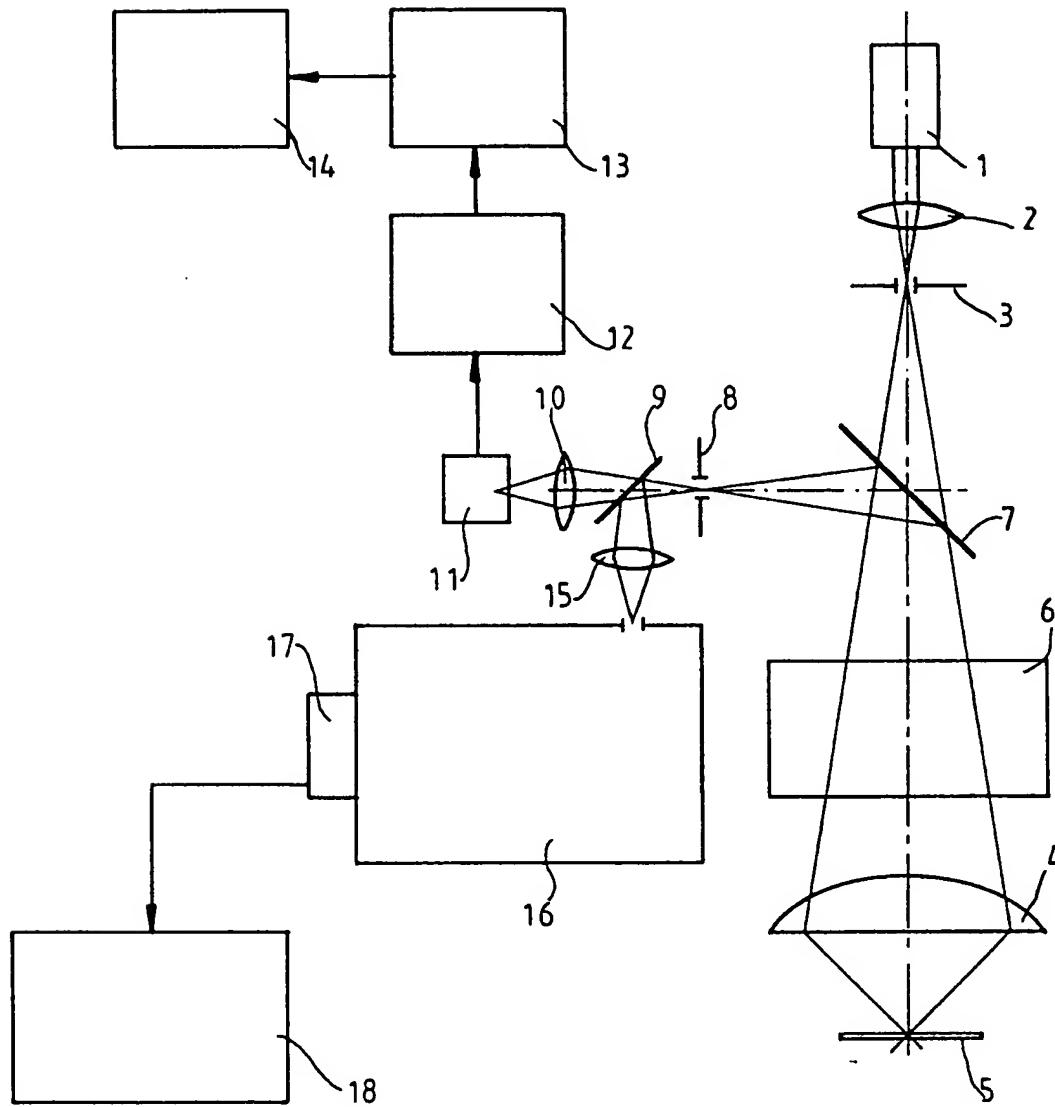


FIG.1

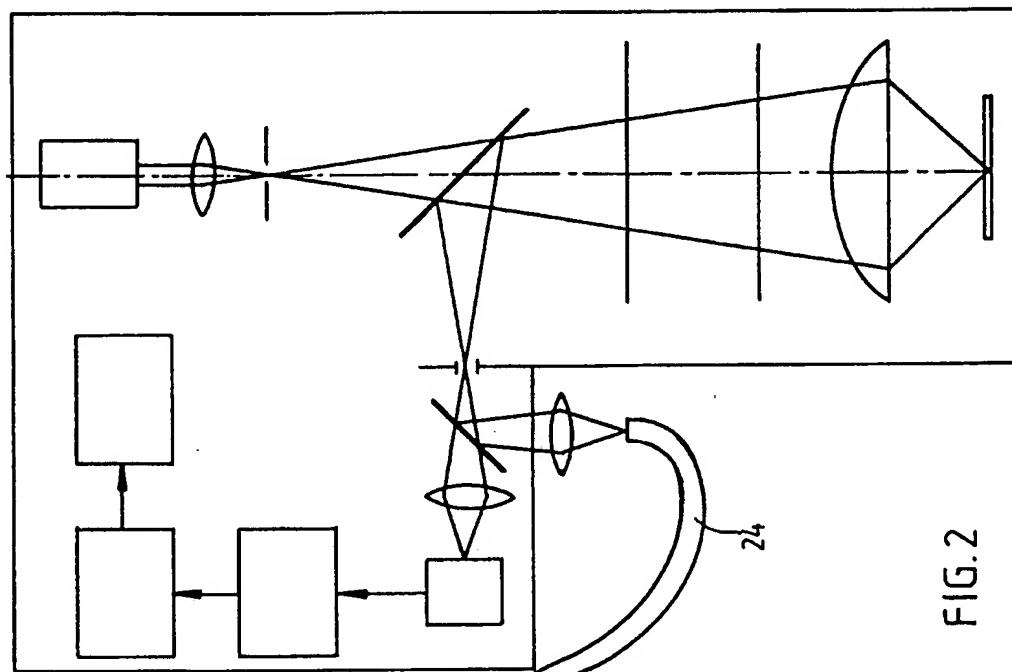
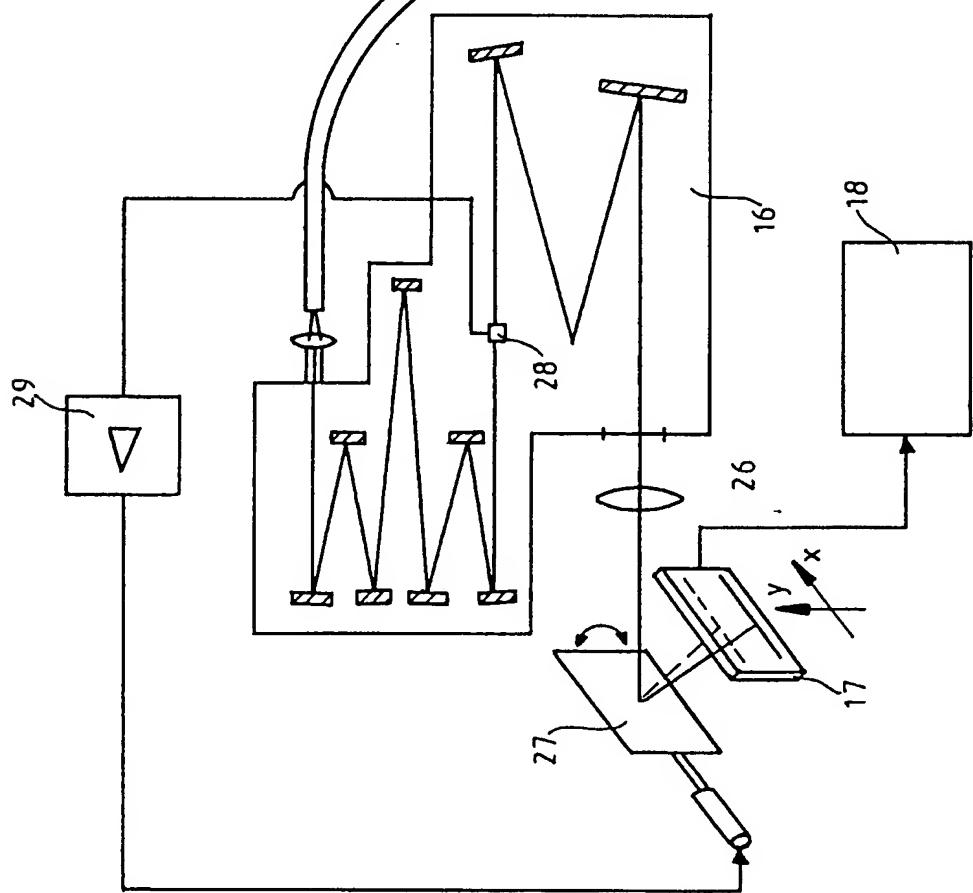
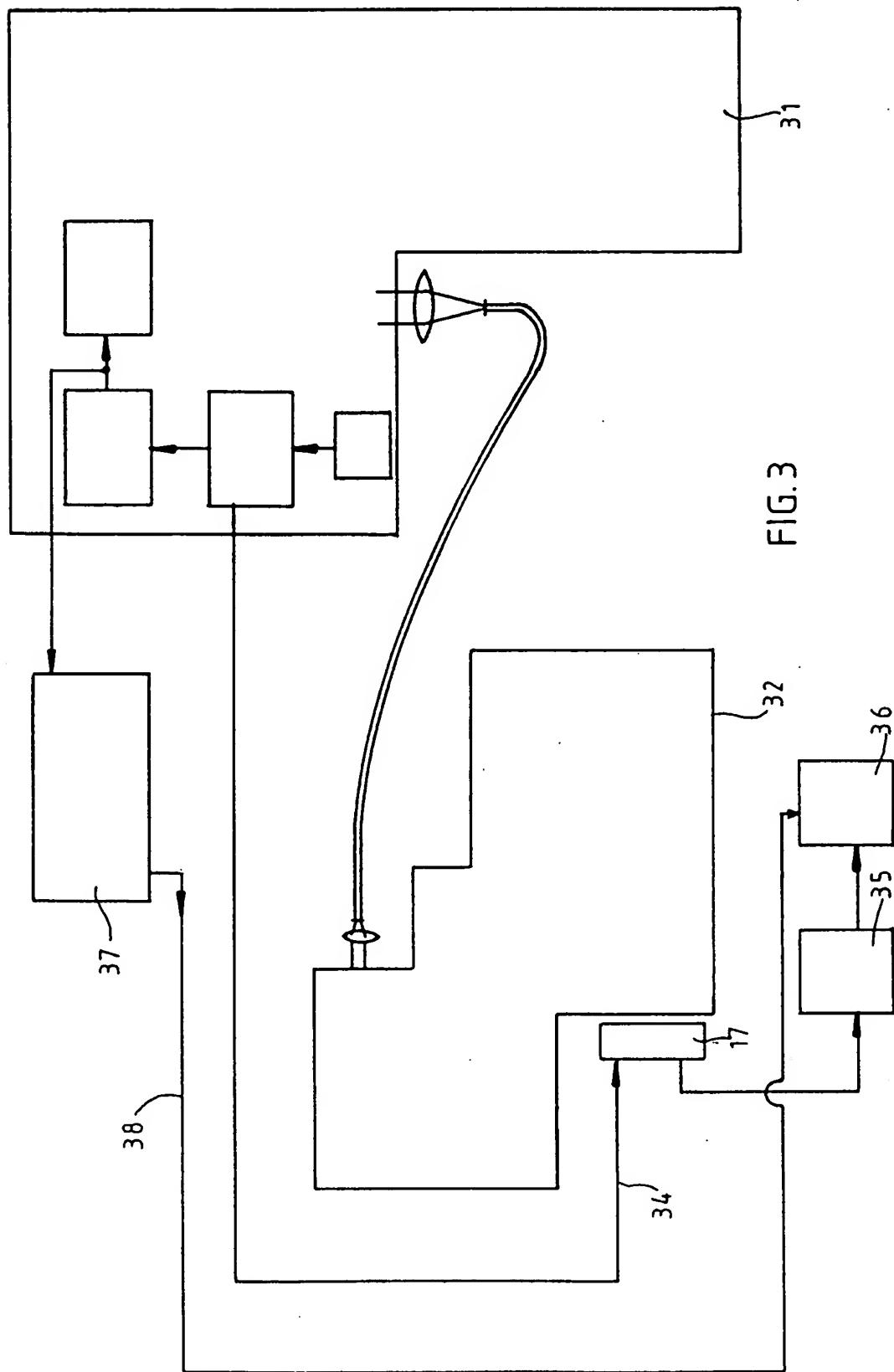


FIG.2





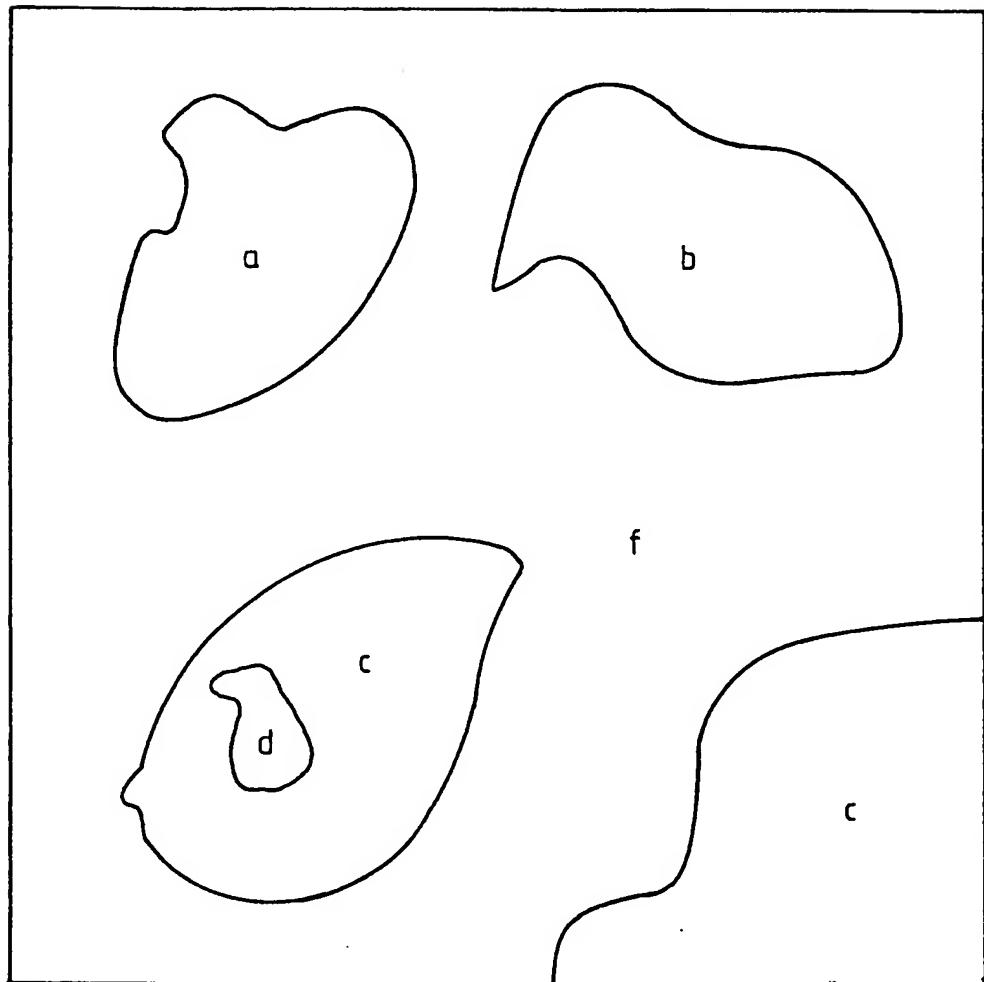


FIG. 4